



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 163 249  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 85106279.4

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: C 12 N 15/00  
C 12 P 21/02, C 07 K 13/00  
C 12 N 1/20  
//(C12N1/20, C12R1:19)

(22) Anmeldetag: 22.05.85

(30) Priorität: 29.05.84 DE 3419995

(72) Erfinder: Uhlmann, Eugen, Dr.  
Washington Street 287  
Belmont Mass. 02178(US)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
04.12.85 Patentblatt 85/49

(72) Erfinder: Wengenmayer, Friedrich, Dr.  
Am Seyenbach 38  
D-6238 Hofheim am Taunus(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(72) Erfinder: Müllner, Hubert, Dr.  
Pestalozzistrasse 4  
D-6233 Kelkheim (Taunus)(DE)

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Winnacker, Ernst-Ludwig, Prof. Dr.  
Dall'Armi-Strasse 41a  
D-8000 München 19(DE)

(72) Erfinder: Engels, Joachim, Dr.  
Feldbergstrasse 1  
D-6242 Kronberg/Taunus(DE)

(72) Erfinder: Mertz, Ronald, Dr.  
Ursulastrasse 5  
D-8000 München 40(DE)

(72) Erfinder: Okazaki, Hiroshi, Dr.  
11-15, Yayoicho 6-chome Nakano-ku  
Tokyo(JP)

(54) Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-2 und Mittel zur Durchführung dieses Verfahrens.

(57) Mit Hilfe einer synthetischen DNA-Sequenz kann in einem gentechnologischen Verfahren Human-Interleukin-2 gewonnen werden. Das Gen wird vorteilhaft in Form mehrerer Fragmente synthetisiert, die enzymatisch zu größeren Teilsequenzen ligiert werden, welche in Hybridplasmide eingebaut und in Wirtsorganismen amplifiziert werden. Nach Reisolierung der Teilsequenzen werden diese zum Gesamtgen vereinigt, in ein Hybridplasmid eingebaut und dieses in einem Wirtsorganismus zur Expression gebracht.

EP 0 163 249 A2

Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Human-  
Interleukin-2 und Mittel zur Durchführung dieses Ver-  
fahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-2 und davon abgeleitete Polypeptide mit biologischer und immunologischer Aktivität von Human-Interleukin-2, chemisch synthetisierte Gene, die diese

5 Peptide codieren sowie geeignete Vektorkonstruktionen und Wirtsorganismen zur Expression dieser Polypeptide.

Human-Interleukin-2, im folgenden "IL-2", ist ein Polypeptid aus 133 Aminosäuren. Die DNA-Sequenz des menschlichen IL-2

10 sowie dessen gentechnologische Synthese sind in der Europäischen Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer EP 0 091 539 A1 beschrieben (Amino Acid Sequence II der Fig. 2b). Dieser Synthese liegt eine aus Säugetierzellen isolierte mRNA zugrunde, welche in cDNA überführt, in Vektoren eingebaut und in Wirtszellen, darunter auch E.coli, 15 zur Expression gebracht wurde.

Bakterien, insbesondere E.coli, sind aus einer Reihe von Gründen bevorzugte Wirtszellen für die gentechnische

20 Produktion von Polypeptiden. Gene eukaryotischer Zellen, die - wie in der genannten Patentanmeldung beschrieben - durch Reverse Transcriptase aus mRNA erhalten wurden, werden häufig nach Einbau in Plasmide und Transformation in Bakterien nur unbefriedigend exprimiert. Die Erfindung betrifft 25 deshalb eine synthetische DNA-Sequenz, die für IL-2 codiert, welche besonders vorteilhaft in E.coli zur Expression eines Polypeptids mit IL-2-Aktivität führt. Ferner umfaßt die Erfindung solche DNA-Sequenzen, die gegen die synthetische DNA-Sequenz hybridieren und die sich aus dieser durch eine 30 fache oder multiple Substitutionen, Deletionen oder Inser-

tionen von Basen ableiten. Der Austausch, die Insertion oder die Deletion von Codons oder eine Kombination davon führt zu Peptiden mit einer oder mehreren ausgetauschten Aminosäure(n) oder zu längeren oder kürzeren IL-2-Derivaten, die ebenfalls 5 Gegenstand der Erforschung sind. Diese Polypeptide mit der biologischen oder immunologischen Aktivität des IL-2 können in ihren Eigenschaften derart verändert sein, daß die Stabilität des Peptids erhöht ist, die Lipophilie des Polypeptids zugunsten einer besseren Löslichkeit verändert ist, die 10 Applikation als Arzneimittel erleichtert ist oder aber die biologische Aktivität erhöht ist.

Der genetische Code ist bekanntlich "entartet", d.h. daß nur für zwei Aminosäuren eine einzige Nucleotid-Sequenz 15 codiert, während den restlichen 18 genetisch codierbaren Aminosäuren 2 bis 6 Triplets zuzuordnen sind. Von den hierdurch gegebenen Variationsmöglichkeiten machen jedoch die Wirtszellen unterschiedlicher Spezies nicht immer den gleichen Gebrauch. Für die Synthese der Gene besteht somit 20 eine unübersehbare Vielfalt von Codon-Möglichkeiten.

Es wurde nun gefunden, daß die DNA-Sequenz I (Anhang), die für die gesamte Aminosäuresequenz 1-133 von IL-2 codiert, sowie die zur Synthese der Sequenz I benutzten DNA- 25 Teilsequenzen (Sequenz II, Anhang, mit den Teilsequenzen IIa (IL 2-I) bis II d (IL 2-IV) besonders vorteilhaft für die gentechnologische Synthese von IL-2 sind. Am 5'-Ende des codierenden Stranges der DNA-Sequenz I befindet sich eine "überhängende" DNA-Sequenz, beispielsweise entsprechend der 30 Restriktionsendonuclease Eco RI, am 3'-Ende des codierenden Stranges dagegen eine andere einzelsträngige, überhängende Sequenz, beispielsweise entsprechend dem Restriktionsenzym Sal I. Diese beiden unterschiedlichen Erkennungssequenzen gewährleisten die Insertion der DNA in Plasmide in der ge-

wünschten Orientierung. Selbstverständlich können auch andere überstehende Sequenzen gewählt werden, die Schnittstellen im vorgesehenen Vektor entsprechen.

5 Diese Erkennungssequenzen erlauben nicht nur die Reisoliierung der DNA aus einem Vektor durch Schneiden mit den entsprechenden Enzymen, beispielsweise Eco RI und SalI, sondern auch zahlreiche Modifikationen der DNA wie Entfernung der einzelsträngigen Bereiche, beispielsweise mit Mung Bean-

10 Nuclease, völliges oder teilweises Auffüllen des kürzeren Endes, beispielsweise mit Kleenow-Polymerase, oder die Addition geeigneter Adapter oder Linker. Die überlappenden Enden sind daher außerordentlich vorteilhaft für den Einbau der erfindungsgemäßen DNA in Expressionsvektoren.

15 Zwischen diesen Erkennungssequenzen und den Codons für die Aminosäurefolge befindet sich am 5'-Ende des codierenden Stranges das Codon für die Aminosäure Methionin (das in der DNA-Sequenz I mit 0 beziffert ist). Alternativ hierzu kann

20 eine Praesequenz (auch Signal- oder leader-Sequenz genannt), eines bakteriellen oder sonstigen wirtseigenen Proteins stehen (Übersichtsartikel: Perlman und Halvorson; J. Mol. Biol. 167 (1983), 391), welche die Sekretion des gewünschten Polypeptids aus dem Cytoplasma bewirkt und bei

25 diesem Exkretionsprozeß von einer in der Wirtszelle natürlich vorkommenden Signal-Peptidase abgespalten wird. Am Ende des codierenden Stranges folgt bzw. folgen dann auf das für Threonin codierende Triplet 133 ein bzw. vorzugsweise zwei Stop-Triplet(s). Im Anhang ist die DNA-Sequenz I, welche

30 die Nucleotide 9 bis 407 (Aminosäuren 1-133) umfaßt, im Zusammenhang mit der Nucleotidsequenz 1 bis 8 (überstehende Sequenz gemäß Eco RI und Met-Codon) und zwei Stop-Codons (Nucleotide 408 bis 413) sowie der überstehenden Sequenz gemäß SalI dargestellt. Die zwei Stop-Codons stellen eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar. Sie gewähr-

35

leisten, daß selbst bei hoher Proteinsyntheserate die Moleküle am gewünschten Ende "abgeschnitten" werden und keine "Fusionsproteine" gebildet werden.

5 Drei interne singuläre Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Pst I, Xba I und Sac I (Nucleotide 69-74, 182-187 und 291-296 des codierenden Stranges der DNA-Sequenz I) ermöglichen die Subklonierung von vier Genfragmenten IL 2-I bis IL 2-IV, die in gut untersuchten Klonierungsvektoren, wie etwa pUC 12, eingebaut werden können. Zusätzlich wurden innerhalb des Strukturgens eine Reihe von weiteren singulären Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingebaut, die einerseits einen Zugang zu Teilsequenzen des IL-2 schaffen und andererseits die Durchführung von Variationen erlauben:

15

Restriktionsenzym	Erkennungs- sequenz	Position des ersten Nukleotids der Er- kennungssequenz (codierender Strang)
-------------------	------------------------	--

	5'	3'	
20			
Aha II	GGCGCC		8
Ava II	GGACC		65
Ban I	GGCGCC		8
Ban II	GAGCTC		291
25			
Bbv I	GCTGC		59
Bst NI	CCTGG		221
Dde I	CTCAG		226
Fnu 4HI	GCTGC		59
Hae II	GGCGCC		8
30			
Hha I	GCGC		9
Hinf I	GACTC		35
Hph I	TCACC		373
Mlu I	ACGCGT		117
Nar I	GGCGCC		8
35			
Pvu I	CGATCG		346
Sau 96 I	GGACC		65
Scr FI	CCTGG		221

Die DNA-Sequenz I lässt sich aus 38 Oligonucleotiden unterschiedlicher Länge aufbauen (siehe DNA-Sequenz II), indem diese zunächst chemisch synthetisiert und dann über "sticky ends" von 4 bis 9 Nucleotiden enzymatisch verknüpft werden.

5

Bei der DNA-Sequenz I wurde weiterhin berücksichtigt, daß bei denjenigen Aminosäuren, denen mehrere Codons zuzuordnen sind, diese nicht gleichwertig sind, sondern vielmehr in der jeweiligen Wirtszelle wie E. coli unterschiedliche Präferenzen zeigen. Weiterhin wurden palindromische Sequenzen auf ein Mindestmaß reduziert.

10

Die Genstruktur der DNA-Sequenz I ist somit leicht aus relativ kleinen Bausteinen zugänglich, ermöglicht die Subklonierung von vier Genfragmenten in gut bekannte Vektoren und erlaubt deren Kombination zum Gesamtgen. Die singulären Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme erleichtern außerordentlich die Bildung von Verlängerungen, Veränderungen und Verkürzungen des Proteinmoleküls.

15

Verlängerungen werden nach Umsetzung mit dem jeweiligen Restriktionsenzym durch Addition geeigneter, chemisch synthetisierter DNA-Moleküle erhalten. Veränderungen werden durch Herausschneiden einzelner Abschnitte der DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen und Ersetzen durch andere, chemisch gewonnene DNA-Sequenzen erhalten. Verkürzungen können nach Spaltung mit dem jeweiligen Restriktionsenzym durch Umsetzung mit Nucleasen erhalten werden.

20

Die biologische Aktivität der verlängerten, veränderten oder verkürzten Moleküle kann in einem biologischen Testsystem geprüft werden, beispielsweise durch Induktion des Zellwachstums einer T-Zell-Population, die von der Anwesenheit des IL-2 im Medium für die Vermehrung streng abhängig ist.

Der Einbau der synthetischen Gene bzw. Genfragmente in Klonierungsvektoren, beispielsweise in handelsübliche Plasmide wie pUC 12 bzw. andere allgemein zugängliche Plasmide wie ptac 11, ptrp H1 und pKK 177.3, erfolgt in an sich bekannter Weise. Auch können die chemisch synthetisierten Gene zuvor mit geeigneten chemisch synthetisierten Kontrollregionen versehen werden, die eine Expression der Proteine ermöglichen. Hierzu kann auf das Lehrbuch von Maniatis (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor, 1982) verwiesen werden. Die Transformation der so erhaltenen Hybridplasmide in geeignete Wirtsorganismen, vorteilhaft E. coli, ist ebenfalls an sich bekannt und in dem vorstehend genannten Lehrbuch eingehend beschrieben.

15 Die erfindungsgemäß erhaltenen Genfragmente IL 2-I bis IL 2-IV, die damit erhaltenen Hybridplasmide und die transformierten Wirtsorganismen sind ebenfalls neu und Gegenstand der Erfindung. Dasselbe gilt für aus der DNA-Sequenz I abgewandelte neue DNA-Sequenzen. Weitere Ausgestaltungen der 20 Erfindung sind in den Patentansprüchen niedergelegt.

In den folgenden Beispielen werden noch einige Ausgestaltungen der Erfindung im einzelnen erläutert, woraus sich die Vielzahl der möglichen Abwandlungen und Kombinationen für den Fachmann ergeben. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Gewicht, wenn nichts anderes angegeben ist.

Beispiele1. Chemische Synthese eines einzelsträngigen  
Oligonucleotids

5 Am Beispiel des Genbausteins Ia, der die Nucleotide 1-17  
des codierenden Strangs umfaßt, wird die Synthese der  
Genbausteine erläutert. Nach bekannten Methoden (M.J.  
Gait et al., Nucleic Acids Res. 8 (1980) 1081-1096))  
wird das am 3'-Ende stehende Nucleosid, im vorliegenden  
10 Falle also Cytidin (Nucleotid Nr. 17), an Kieselgel  
(R)FRACTOSIL, Firma Merck) über die 3'-Hydroxyfunktion  
covalent gebunden. Hierzu wird zunächst das Kieselgel  
unter Abspaltung von Ethanol mit 3-(Triethoxysilyl)-  
propylamin umgesetzt, wobei eine Si-O-Si-Bindung ent-  
15 steht. Das Cytidin wird als N<sup>4</sup>-Benzoyl-3'-O-succinoyl-  
5'-dimethoxytritylether in Gegenwart von Paranitro-  
phenol und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid mit dem  
modifizierten Träger umgesetzt, wobei die freie Carboxy-  
gruppe der Succinoylgruppe den Aminorest der Propylamino-  
20 gruppe acyliert.

In den folgenden Syntheseschritten wird die Basenkompo-  
nente als 5'-O-Dimethoxytrityl-nucleosid-3'-phosphorig-  
säuremonomethylester-dialkylamid oder -chlorid einge-  
setzt, wobei das Adenin als N<sup>6</sup>-Benzoyl-Verbindung, das  
25 Cytosin als N<sup>4</sup>-Benzoyl-Verbindung, das Guanin als  
N<sup>2</sup>-Isobutyryl-Verbindung und das keine Aminogruppe ent-  
haltende Thymin ohne Schutzgruppe vorliegen.

30 50 mg des polymeren Trägers, der 2 µmol Cytosin gebunden  
enthält, werden nacheinander mit den folgenden Agentien  
behandelt:

- a) Nitromethan,
- 35 b) gesättigte Zinkbromidlösung in Nitromethan mit 1 %

Wasser,  
c) Methanol,  
d) Tetrahydrofuran,  
e) Acetonitril,  
5 f) 40 µmol des entsprechenden Nucleosidphosphits und 200  
µmol Tetrazol in 0,5 ml wasserfreiem Acetonitril (5  
Minuten),  
g) 20 % Acetanhydrid in Tetrahydrofuran mit 40 % Lutidin  
und 10 % Dimethylaminopyridin (2 Minuten),  
10 h) Tetrahydrofuran,  
i) Tetrahydrofuran mit 20 % Wasser und 40 % Lutidin,  
j) 3 % Jod in Kollidin/Wasser/Tetrahydrofuran im Volu-  
menverhältnis 5:4:1,  
k) Tetrahydrofuran und  
15 l) Methanol.

Unter "Phosphit" wird hierbei der Desoxyribose-3'-mono-  
phosphorigsäure-monomethylester verstanden, wobei die  
dritte Valenz durch Chlor oder eine tertiäre Amino-  
gruppe, beispielsweise einen Morpholinorest, abgesättigt  
20 ist. Die Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte können  
jeweils nach der Detritylierungsreaktion b) spektropho-  
tometrisch durch Messung der Absorption des Dimethoxy-  
tritylkations bei einer Wellenlänge von 496 nm bestimmt  
werden.  
25

Nach abgeschlossener Synthese des Oligonucleotids werden  
die Methylphosphatschutzgruppen des Oligomers mit Hilfe  
von p-Thiokresol und Triethylamin abgespalten.  
30

Anschließend wird durch 3-stündige Behandlung mit  
Ammoniak das Oligonucleotid vom festen Träger abge-  
trennt. Eine 2- bis 3-tägige Behandlung der Oligomeren  
mit konzentriertem Ammoniak spaltet die Aminoschutz-  
35 gruppen der Basen quantitativ ab. Das so erhaltene Roh-

produkt wird durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

5 Ganz entsprechend werden auch die übrigen Genbausteine Ib-IVj synthetisiert, deren Nucleotidfolge aus der DNA-Sequenz II hervorgeht.

10 2. Enzymatische Verknüpfung der einzelsträngigen Oligonucleotide zu den Genfragmenten IL 2-I bis IL 2-IV.

Zur Phosphorylierung der Oligonucleotide am 5'-Terminus wurde je 1 nmol der Oligonucleotide Ia und Ib mit 5 nmol Adenosintriphosphat mit vier Einheiten T4-Polynucleotid-Kinase in 20 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minuten bei 37°C behandelt (C.C. Richardson, Progress in Nucl. Acids Res. 2 (1972) 825). Das Enzym wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C desaktiviert.

20 Anschließend werden die Oligonucleotide Ia und Ib gegeneinander hybridisiert, indem man sie in wässriger Lösung 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann langsam auf 5°C abkühlt.

25 Analog werden die Oligonucleotide Ic und Id sowie Ie und If phosphoryliert und paarweise hybridisiert. Für das Subfragment IL 2-II werden die Oligonucleotide IIIa mit IIIb usw. bis IIIi mit IIIj, für das Subfragment IL 2-III die Oligomeren IIIa mit IIIb usw. bis IIIk mit IIIl und für das Subfragment IL 2-IV die Oligomeren IVa mit IVb usw. bis IVi mit IVj phosphoryliert und paarweise hybridisiert.

35 Die so erhaltenen drei Oligonucleotidpaare für das Genfragment IL 2-I, die fünf Oligonucleotidpaare

für die Genfragmente IL 2-II und IL 2-IV sowie die sechs Oligonucleotidpaare für das Genfragment IL 2-III werden jeweils wie folgt ligiert:

5 Die doppelsträngigen Nucleotide werden vereinigt und in jeweils 40 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer, 20 mM Magnesiumchlorid und 10 mM DTT mit Hilfe von 100 Einheiten T4-DNA-Ligase bei 15°C im Laufe von 16 Stunden ligiert.

10 Die Reinigung der Genfragmente IL 2-I bis IL 2-IV erfolgt durch Gelelektrophorese auf einem 10%igen Polyacrylamidgel (ohne Harnstoffzusatz, 20 • 40 cm, 1 mm Dicke), wobei als Markersubstanz ØX 174 DNA (Fa. BRL), geschnitten mit Hinf I, oder pBR 322, geschnitten mit Hae III, diente.

15

3. Herstellung von Hybridplasmiden, die die Genfragmente IL 2-I bis IL 2-IV enthalten

20 a) Einbau des Genfragmentes IL-2-I in pUC 12

Das Plasmid pUC 12 entspricht dem Plasmid pUC 8 (Vieira et al., Gene 19 (1982) 259-268; Messing et al., ibid. 269-276), enthält allerdings einen etwas vergrößerten Polylinker mit den zusätzlichen Restriktionsstellen für die Enzyme XbaI und SacI (Norlander et al., Gene 26 (1983) 101-106). Das Plasmid wird mit den Enzymen EcoRI und PstI inkubiert. Hierdurch wird ein etwa 40 Basenpaare großes Polynucleotid aus dem Plasmid herausgeschnitten. Die Abtrennung dieses Fragments vom geöffneten Plasmid gelingt entweder durch Chromatographie an (R)<sub>n</sub>SEPHADEX G50 oder durch Elektrophorese an 1,5 %iger Agarose in bekannter Weise (Maniatis). Auf eine Abtrennung des Fragments kann auch verzichtet werden, da Plasmide mit

der Insertion von IL 2-I leicht durch Ausplattieren erkannt werden können (wie im folgenden ausgeführt wird):

5 In das geöffnete Plasmid wird das Fragment IL 2-I wie folgt enzymatisch eingesetzt, wobei das Plasmid p 145/3 (Figur 1) gebildet wird:

10 Die DNA wird in einer Mischung aus 50 mM Tris (pH 7,6), 5 mM ATP, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5mM MgCl<sub>2</sub> und ca. 100 Einheiten T4 DNA-Ligase 16 Stunden bei 12°C ligiert. Anschließend wird das Plasmid in E.coli K 12 (JM 103), kompetent gemacht mit 70 mM CaCl<sub>2</sub>, transformiert.

15 Bakterien, die das Plasmid p 145/3 enthalten, können auf Agar-Platten mit 50 µg/ml Ampicillin, 1 mM Isopropyl-Thiogalactosid (IPTG) und 2 % 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) als "weiße" Kolonie entdeckt werden. Eventuell noch unverändertes oder nicht vollständig geschnittenes Plasmid pUC 12 verursacht "blaue" Bakterienkolonien. Etwa fünf der weißen Bakterienklone werden kultiviert und die enthaltenen Plasmide in bekannter Weise (Maniatis) isoliert.

20  
25  
30 Die Größe der Insertion wird durch Inkubation mit den Restriktionsenzymen PstI und EcoRI und anschließende Elektrophorese auf 10%igem Polyacrylamidgelen überprüft. Hierauf erfolgt eine Sequenzierung der Insertion nach Maxam und Gilbert (Methods Enzymol. 65 (1980) 499) oder Sanger und Coulson (J. Mol. Biol. 94 (1975) 441).

b) Einbau des Genfragments IL 2-II in pUC 12

5

Analog zu a) wird das Plasmid pUC 12 mit den Restriktionsenzymen Pst I und Xba I umgesetzt und, ggf. nach Abtrennung des entstandenen Oligonucleotids, das Fragment IL 2-II enzymatisch eingebaut. Es entsteht das Plasmid p 147/1 (Figur 2).

10

c) Einbau des Genfragments IL 2-III in pUC 12

15

Analog zu a) wird das Plasmid pUC 12 mit den Restriktionsenzymen Xba I und Sac I umgesetzt und das Fragment IL 2-III enzymatisch eingebaut. Es entsteht das Plasmid p 138/25 (Figur 3).

20

d) Einbau des Genfragments IL 2-IV in pUC 12

Analog zu a) wird das Plasmid pUC 12 mit den Restriktionsenzymen Sac I und Sal I geschnitten und das Fragment IL 2-IV enzymatisch eingebaut. Es entsteht das Plasmid p 143/1 (Figur 4).

4. Verknüpfung der Genfragmente

25

Nach Vermehrung der Plasmide p 145/3, p 147/1, p 138/25 und p 143/1 und Bestätigung der Sequenz werden die Subfragmente IL 2-I bis IL 2-IV erneut mit den entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten und durch Elektrophorese auf Polyacrylamid abgetrennt. Nach Eintauchen der Gele in eine wäßrige Lösung von Ethidiumbromid werden die Banden unter UV-Licht identifiziert, herausgeschnitten und die DNA in bekannter Weise eluiert (Maniatis).

35

Die Subfragmente IL 2-I bis IL 2-IV werden wie unter 3 a)

beschrieben enzymatisch verknüpft und in das durch Umsetzen mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I geöffnete Plasmid pUC 12 eingebaut. Man erhält das Hybridplasmid p 159/6 (Figur 5), dessen Sequenz nochmals durch Analyse bestätigt wird.

5           5. Konstruktion von Hybridplasmiden für die Expression der DNA-Sequenz I

10          a) Einbau in pKK 177.3

Das Expressionsplasmid pKK 177.3 (Plasmid ptac 11, Amman et al., Gene 25 (1983) 167, bei dem in die Eco RI-Erkennungsstelle synthetisch eine Sequenz eingebracht wurde, die eine Sal I-Schnittstelle enthält) wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I geöffnet. Aus dem Plasmid p 159/6 (Figur 5) wird die DNA-Sequenz I mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I herausgeschnitten und auf Polyacrylamid oder 2%ige niedrig-schmelzende (low melting) Agarose gegeben, von der Plasmid-DNA abgetrennt und die Insertion wiedergewonnen (Maniatis). Durch Ligation des aufgeschnittenen Plasmids pKK 177.3 mit der DNA-Sequenz I wird ein Hybridplasmid geschaffen, bei dem der Insertion eine Expressions- bzw. Regulationsregion vorgeschaltet ist. Nach Zugabe eines geeigneten Induktors wie IPTG wird eine mRNA gebildet, die zur Expression des Polypeptids entsprechend der DNA-Sequenz I führt.

25          b) Einbau in p trp H1

Das Expressionsplasmid p trp H1 (Amann et al., Gene 25 (1983) 167-178) enthält die Kontrollelemente des

Trp-Operons (Promotor, Operator), gefolgt von einer Hind III-Restriktionsstelle (Fig. 6).

Nach Isolieren der DNA-Sequenz I aus p 159/6 werden  
5 die überstehenden Enden mit Mung Bean Nuclease nach Angaben des Herstellers (PL Biochemicals) abgebaut. p trp H1 wird mit Hind III geöffnet und die überstehenden Enden ebenfalls mit Mung Bean Nuclease entfernt. Die DNA-Sequenz I wird dann "stumpfendig"  
10 mit T 4 DNA-Ligase in das geöffnete Plasmid eingebaut (Fig. 6).

Durch das Triplet ATG für Methionin in Position 0 wird der Start für die Proteinsynthese festgelegt.  
15 Die Expression wird durch Abwesenheit von Tryptophan und/oder Anwesenheit von Indolylacrylessigsäure induziert.

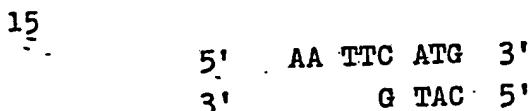
## 6. Darstellung von Modifikationen

20 a) Verkürzungen am C-terminalen Ende des Proteins

Zur Darstellung von verkürzten Proteinmolekülen mit biologischer Aktivität des IL-2 wurde das Plasmid  
25 p 159/6 mit dem Restriktionsenzym Sal I umgesetzt und anschließend in an sich bekannter Weise mit Exonuclease III und S 1-Nuclease inkubiert. Nach Umsetzung mit Eco RI wurden nun Teilsequenzen des IL-2 erhalten, die an einem Ende die überlappenden Sequenzen für  
30 Eco RI tragen und am anderen Ende stumpfendig sind. Nach Addition einer chemisch synthetisierten DNA, die an einem Ende stumpfendig ist und hier als erstes Codon ein Stop-Codon aufweist, am anderen Ende dagegen den Überhang einer Sal I-Sequenz trägt, kann diese verkürzte DNA-Sequenz in die gleichen Expressionsvektoren eingebaut werden.

## b) Verkürzungen am N-terminalen Ende des Proteins.

Zur Konstruktion eines Hybridplasmids, das die DNA-Sequenz für die Expression von Des-[Ala<sup>1</sup>]-IL-2 enthält, wird aus dem Plasmid p 159/6 nach an sich bekannten Methoden mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III die DNA-Sequenz I inklusive Polylinker-teil des Plasmids herausgeschnitten, elektrophoretisch vom Restplasmid abgetrennt und mit dem Restriktionsenzym Aha II nachgeschnitten. Das isolierte Aha II-Hind III-Fragment wird wie in Beispiel 5 b) beschrieben "stumpfendig" gemacht und dann mit Sal I nachgeschnitten. Mit Hilfe des folgenden Adapters



20- erhält man nach Ligation mit dem mit Eco RI und Sal I geöffneten Plasmid pKK 177.3 ein neues Hybridplasmid, das das Gen zur Herstellung von Des-[Ala<sup>1</sup>]-IL-2 enthält.

## 7. Transformation der Hybridplasmide.

25 Kompetente E. coli-Zellen werden mit 0,1 bis 1 µg der Hybridplasmide, die die Sequenz I oder Derivate davon enthalten, transformiert und auf Ampicillin enthaltende Agarplatten plattiert. Anschließend lassen sich Klone, 30 die die korrekt integrierte IL-2-Gensequenz oder Derivate davon in den entsprechenden Plasmiden enthalten, durch DNA-Schnellaufarbeitung identifizieren (Maniatis a.a.O.).

## 8. Expression der IL-2-Aktivität aufweisenden Polypeptide

35 Nach Transformation der Hybridplasmide mit der DNA-

Sequenz I oder Derivaten davon in *E. coli* wird ein Polypeptid exprimiert, das außer der IL-2-Aminosäuresequenz bzw. abgewandelte Sequenzen am Aminoterminus noch eine zusätzliche Methionylgruppe trägt.

5

#### 9. Aufarbeitung und Reinigung

Die zur gewünschten optischen Dichte kultivierten Bakterienstämme werden mit einem geeigneten Induktor, 10 beispielsweise IPTG, hinreichend lange, beispielsweise 2-4 Stunden, inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 0,1 % Kresol und 0,1 mM Benzylsulfonylfluorid abgetötet. Auf einem SDS-PAA-Gel ist nach der Induktion eine Proteinbande mit einem Molgewicht von etwa 15 000 Dalton 15 festzustellen. Nach Zentrifugieren oder Filtrieren wird die Zellmasse in einer Pufferlösung (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen und mechanisch aufgeschlossen, beispielsweise mit einer French-Presse bzw. (R)DYNO-Mühle (Fa. Willy Bachofer, Basel), worauf die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert werden.

Ein Teil des IL-2-Proteins verbleibt nach dem Zellaufschluß im Rückstand und kann mit 8 M Harnstoff, 25 6 M Guanidinium-Hydrochlorid, Pufferlösungen mit Detergentien ionischer oder nicht-ionischer Art und ähnlichen Lösemitteln solubilisiert werden. Aus diesen Lösungen wird das die IL-2-Aktivität enthaltende Protein nach üblichen Verfahren gereinigt. Geeignet sind Ionenaustauscher-, Adsorptions-, Gelfiltrationssäulen 30 oder Affinitätschromatographie an Antikörpersäulen. Durch Natriumdodecylsulfat-Acrylamidgel- oder HPLC-Analytik werden Anreicherung und Reinheit des Produktes kontrolliert.

35 Zur biologischen Charakterisierung des IL-2-Proteins

werden T-Zellen verwendet, die strikt abhängig von der Anwesenheit von IL-2 im Medium sind. Die Zellteilungsrate solcher Zell-Linien ist in gewissen Grenzen proportional zur IL-2-Konzentration des Mediums, die daher über die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Thymidin aus dem Medium festgestellt werden kann.

## DNA-Sequenz I

Triplet Nr.						O	1	2	
Aminosäure						Met	Ala	Pro	
Nucleotid Nr.				1					
Cod. Strang		5'		AA	TTC	ATG	GCG	CCG	
<u>nicht cod. Strang</u>		3'		G	TAC	CGC	GGC		
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu
	20				30			40	
ACC	TCT	TCT	TCT	ACC	AAA	AAG	ACT	CAA	CTG
TGG	AGA	AGA	AGA	TGG	TTT	TTC	TGA	GTT	GAC
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln
	50	-			60			70	
CAA	CTG	GAA	CAC	CTG	CTG	CTG	GAC	CTG	CAG
GTT	GAC	CTT	GTG	GAC	GAC	GAC	CTG	GAC	GTC
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys
	80				90			100	
ATG	ATC	CTG	AAC	GGT	ATC	AAC	AAC	TAC	AAA
TAC	TAG	GAC	TTG	CCA	TAG	TTG	TTG	ATG	TTT
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe
	110				120			130	
AAC	CCG	AAA	CTG	ACG	CGT	ATG	CTG	ACC	TTC
TTG	GGC	TTT	GAC	TGC	GCA	TAC	GAC	TGG	AAG

43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu
	140				150			160	
AAA	TTC	TAC	ATG	CCG	AAA	AAA	GCT	ACC	GAA
<u>TTT</u>	AAG	ATG	TAC	GGC	TTT	TTT	CGA	TGG	CTT

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu
	170			180			190		
CTG	AAA	CAC	CTC	CAG	TGT	CTA	GAA	GAA	GAG
<u>GAC</u>	TTT	GTG	GAG	GTC	ACA	GAT	CTT	CTT	CTC

63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu
	200			210			220		
CTG	AAA	CCG	CTG	GAG	GAA	GTT	CTG	AAC	CTG
<u>GAC</u>	TTT	GGC	GAC	CTC	CTT	CAA	GAC	TTG	GAC

73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro
	230			240			250		
GCT	CAG	TCT	AAA	AAT	TTC	CAC	CTG	CGT	CCG
<u>CGA</u>	GTC	AGA	TTT	TTA	AAG	GTG	GAC	GCA	GGC

83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile
	260			270			280		
CGT	GAC	CTG	ATC	TCT	AAC	ATC	AAC	GTT	ATC
<u>GCA</u>	CTG	GAC	TAG	AGA	TTG	TAG	TTG	CAA	TAG

93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr
	290			300			310		
GTT	CTG	GAG	CTC	AAA	GGT	TCT	GAA	ACC	ACG
<u>CAA</u>	GAC	CTC	GAG	TTT	CCA	AGA	CTT	TGG	TGC

0163249

- 20 -

HOE 84/F 119

103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
		320			330			340	
TTC	ATG	TGC	GAA	TAC	GCG	GAC	GAA	ACT	GCG
<u>AAG</u>	<u>TAC</u>	<u>ACG</u>	<u>CTT</u>	<u>ATG</u>	<u>CGC</u>	<u>CTG</u>	<u>CTT</u>	<u>TGA</u>	<u>CGC</u>

113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile
		350			360			370	
ACG	ATC	GTT	GAA	TTT	CTG	AAC	CGT	TGG	ATC
<u>TGC</u>	<u>TAG</u>	<u>CAA</u>	<u>CTT</u>	<u>AAA</u>	<u>GAC</u>	<u>TTG</u>	<u>GCA</u>	<u>ACC</u>	<u>TAG</u>

123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu
		380			390			400	
ACC	TTC	TGC	CAG	TCG	ATC	ATC	TCT	ACC	CTG
<u>TGG</u>	<u>AAG</u>	<u>ACG</u>	<u>GTC</u>	<u>AGC</u>	<u>TAG</u>	<u>TAG</u>	<u>AGA</u>	<u>TGG</u>	<u>GAC</u>

133	134	135							
Thr	-								
	410								
ACC	TGA	TAG			3'				
TGG	ACT	ATC	AGC	T	5'				

0383249

-21-

HOE 84/F 119

## DNA-Sequenz II

## Sequenz IIa (IL 2-I)

← Ia →

Nucleotid Nr.	1	10
Cod. Strang	5' AA TTC ATG GCG CCG	
nicht cod. Strang	3' G TAC CGC GGC	

---

← Ib →

20	30	40
ACC TCT TCT TGG AGA AGA	AGA ACC AAA TGG TTT	TTC AAG ACT CAA TGA GTT GAC

---

← Id →

50	60	70
CAA CTG GAA CAC CTG CTG GTT GAC CTT GTG GAC GAC	GAC CTG GAC CTG G PstI	CTG CA

---

← If →

DNA-Sequenz IIb (IL 2-II)

80	90	100
PstI G ATG ATC CTG AAC GGT ATC AAC AAC AC GTC TAC TAG GAC TTG CCA TAG TTG TTG IIb	TAC AA ATG TT	

---

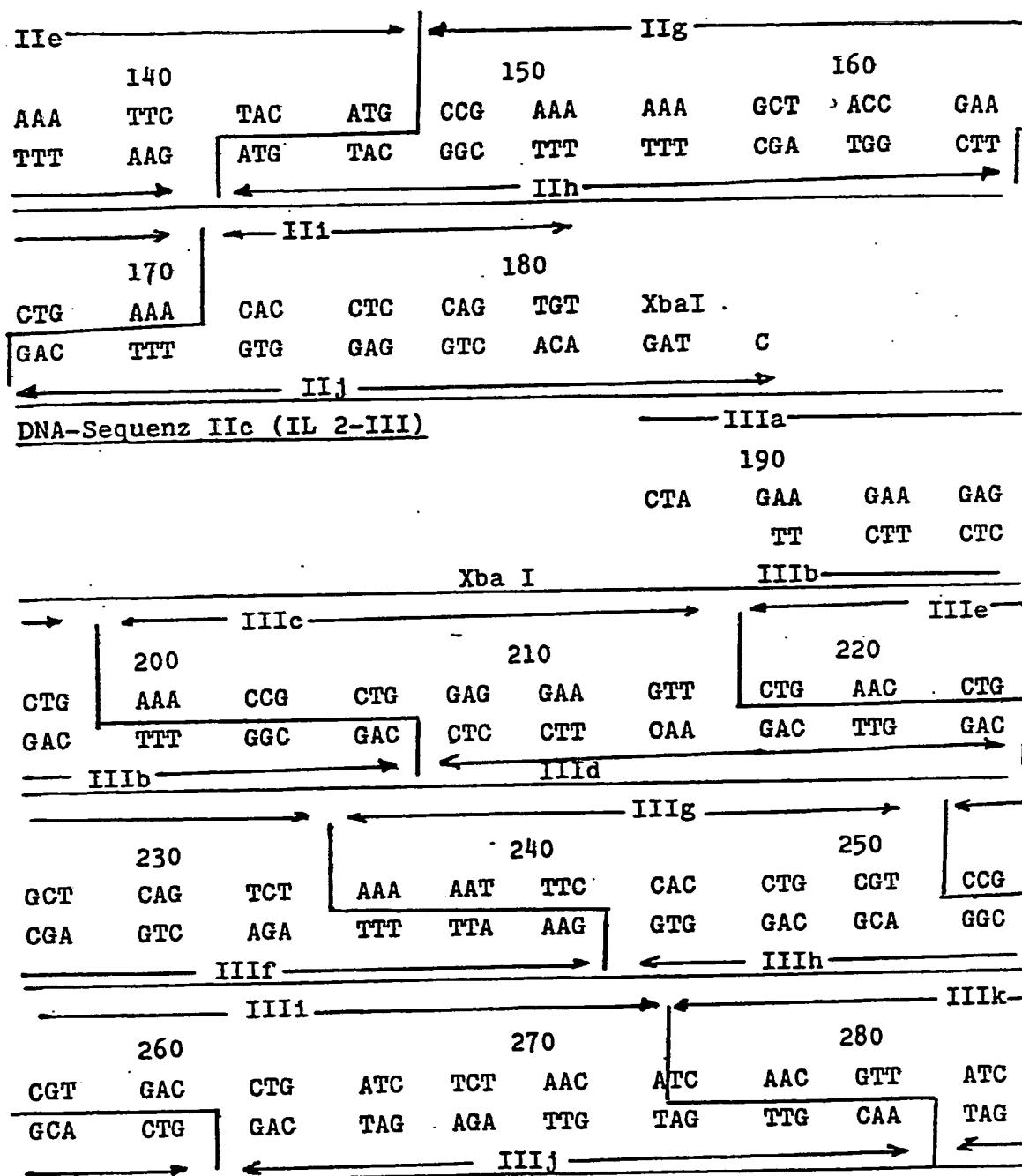
← IIa → ← IIc → ← IIe → ← IIId → ← IIIf →

110	120	130
AAC CCG AAA CTG ACG CGT ATG CTG ACC TTC TTG GGC TTT GAC TGC GCA TAC GAC TGG AAG IIId	TAC GAC	IIIf

0163249

- 22 -

HOE 84/F 11



IIIk →

290

GTT	CTG	GAG	CT
CAA	GAC	C	Sac I

IIIl →

DNA-Sequenz II d (IL 2-IV)

IVa

300 310

Sac I	C	AAA	GGT	TCT	GAA	ACC	ACG
TC	GAG	TTT	CCA	AGA	CTT	TGG	TGC

IV b

IVc

320 330 340

TTC	ATG	TGC	GAA	TAC	GCG	GAC	GAA	ACT	GCG
AAG	TAC	ACG	CTT	ATG	CGC	CTG	CTT	TGA	CGC

IVd

IVe

IVg

350 360 370

ACG	ATC	GTT	GAA	TTT	CTG	AAC	CGT	TGG	ATC
TGC	TAG	CAA	CTT	AAA	GAC	TTG	GCA	ACC	TAG

IVf

IVg

IVi

380 390 400

ACC	TTC	TGC	CAG	TCG	ATC	ATC	TCT	ACC	CTG
TGG	AAG	ACG	GTC	AGC	TAG	TAG	AGA	TGG	GAC

IVh

IVj

IVi →

410

ACC	TGA	TAG	Sal I	3'
TGG	ACT	ATC	AGC	T 5'

IVj →

PATENTANSPRÜCHE:

1. Protein mit der biologischen Aktivität des Human-Inter-leukin-2 (IL-2), dadurch gekennzeichnet, daß es Teilsequenzen oder Derivate des IL-2 aufweist.
- 5 2. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es noch zusätzliche Aminosäuren zur Aminosäuresequenz des IL-2 aufweist.
- 10 3. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Aminosäuresequenz des IL-2 besteht, bei dem jedoch eine oder mehrere Aminosäuren am N-terminalen Ende fehlen.
- 15 4. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Aminosäuresequenz des IL-2 besteht, bei dem jedoch eine oder mehrere Aminosäuren am C-terminalen Ende fehlen.
- 20 5. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Aminosäuresequenz des IL-2 besteht, bei dem jedoch eine oder mehrere Aminosäuren am N-terminalen Ende zusätzlich vorhanden sind.
- 25 6. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es aus der Aminosäuresequenz des IL-2 besteht, bei dem jedoch eine oder mehrere Aminosäuren am C-terminalen Ende zusätzlich vorhanden sind.
- 30 7. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß am C-terminalen Ende noch eine oder mehrere Aminosäuren zusätzlich vorhanden sind.

8. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß am N-terminalen Ende noch eine oder mehrere Aminosäuren zusätzlich vorhanden sind.
- 5 9. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Aminosäuren auch am C-terminalen Ende fehlen.
- 10 10. Protein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß auch am C-terminalen Ende eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuren vorhanden sind.
- 15 11. Protein nach Anspruch 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Aminosäuren der Sequenz des IL-2 ausgetauscht werden.
- 20 12. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von IL-2, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das die DNA-Sequenz I (Nucleotide 9 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) ganz oder teilweise enthält.
- 25 13. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit biologischer Aktivität des IL-2 gemäß Anspruch 3, 4 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das die DNA-Sequenz I (Nucleotid 9 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) ganz oder teilweise enthält.
- 30 14. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit biologischer Aktivität des IL-2 gemäß Anspruch 2, 5, 6, 7, 8 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das zusätzlich zur DNA-Sequenz I (Nucleotide 9 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) oder
- 35

Teilen dieser Sequenz ein oder mehrere Nucleotid-Triplett(s) (entsprechend einer oder mehrerer zusätzlicher Aminosäuren) enthält.

- 5 15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen die DNA-Sequenz I (Nucleotide 6 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 0 bis 133), gefolgt von einem oder zwei Stop-Codon(s), enthält.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen vor dem Tripplett für die erste Aminosäure das Codon ATG aufweist und nach der letzten Aminosäure zwei Stop-Codons aufweist.
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtsorganismus *E. coli* dient.
18. DNA-Sequenz I mit den Nucleotiden 9 bis 407 (Aminosäuren 1 bis 133).
- 20 19. DNA-Sequenz I mit den Nucleotiden 6 bis 407 (Aminosäuren 0 bis 133), gefolgt von einem oder zwei Stop-Codon(s).
- 25 20. DNA-Sequenzen II a (IL 2-I), II b (IL 2-II), II c (IL 2-III) und II d (IL 2-IV).
21. DNA-Oligonucleotide I a bis IV j.
22. Hybridplasmide, die zwischen einer Eco RI- und einer 30 Pst I-Schnittstelle die DNA-Sequenz II a (IL 2-I) enthalten.
23. Hybridplasmide, die zwischen einer Pst I- und einer Xba I-Schnittstelle die DNA-Sequenz II b (IL 2-II) enthalten.

24. Hybridplasmide, die zwischen einer Xba I- und einer Sac I-Schnittstelle die DNA-Sequenz II c (IL 2-III) enthalten.
- 5 25. Hybridplasmide, die zwischen einer Sac I- und einer Sal I-Schnittstelle die DNA-Sequenz II d (IL 2-IV) enthalten.
- 10 26. Hybridplasmide, die zwischen einem Eco RI- und einer Sal I-Schnittstelle die DNA-Sequenz I enthalten.
27. Hybridplasmide, die die DNA-Sequenz I (Nucleotide 6-413) enthalten.
- 15 28. Wirtsorganismen, die Hybridplasmide nach Anspruch 22 bis 27 enthalten.
29. E. coli, enthaltend ein Hybridplasmid nach Anspruch 12 bis 27.

Patentansprüche für Österreich

1. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von IL-2, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das die DNA-Sequenz I (Nucleotide 9 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) ganz oder teilweise enthält.
2. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit biologischer Aktivität des IL-2, das aus der Aminosäuresequenz des IL-2 besteht, bei dem jedoch eine oder mehrere Aminosäuren am N-terminalen Ende und/oder am C-terminalen Ende fehlen, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das die DNA-Sequenz I (Nucleotid 9-bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) ganz oder teilweise enthält.
3. Gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit biologischer Aktivität des IL-2, bei dem noch zusätzlich Aminosäuren zur Aminosäuresequenz des IL-2 am N-terminalen Ende und/oder am C-terminalen Ende vorhanden sind, oder an einem der Enden Aminosäuren fehlen und an anderen noch eine oder mehrere Aminosäuren zusätzlich vorhanden sind, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Gen eingesetzt wird, das zusätzlich zur DNA-Sequenz I (Nucleotide 9 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 1 bis 133) oder Teilen dieser Sequenz ein oder mehrere Nucleotid-Triplett(s) (entsprechend einer oder mehrerer zusätzlicher Aminosäuren) enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen die DNA-Sequenz I (Nucleotide 6 bis 407 entsprechend den Aminosäuren 0 bis 133), gefolgt von einem oder zwei Stop-Codon(s), enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen vor dem Triplet für die erste Amino-

säure das Codon ATG aufweist und nach der letzten Aminosäure zwei Stop-Codons aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
5 net, daß als Wirtsorganismus E. coli dient.

0163249

1/3

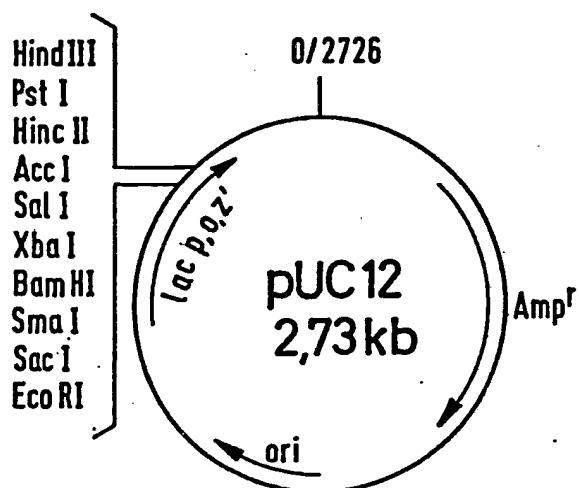
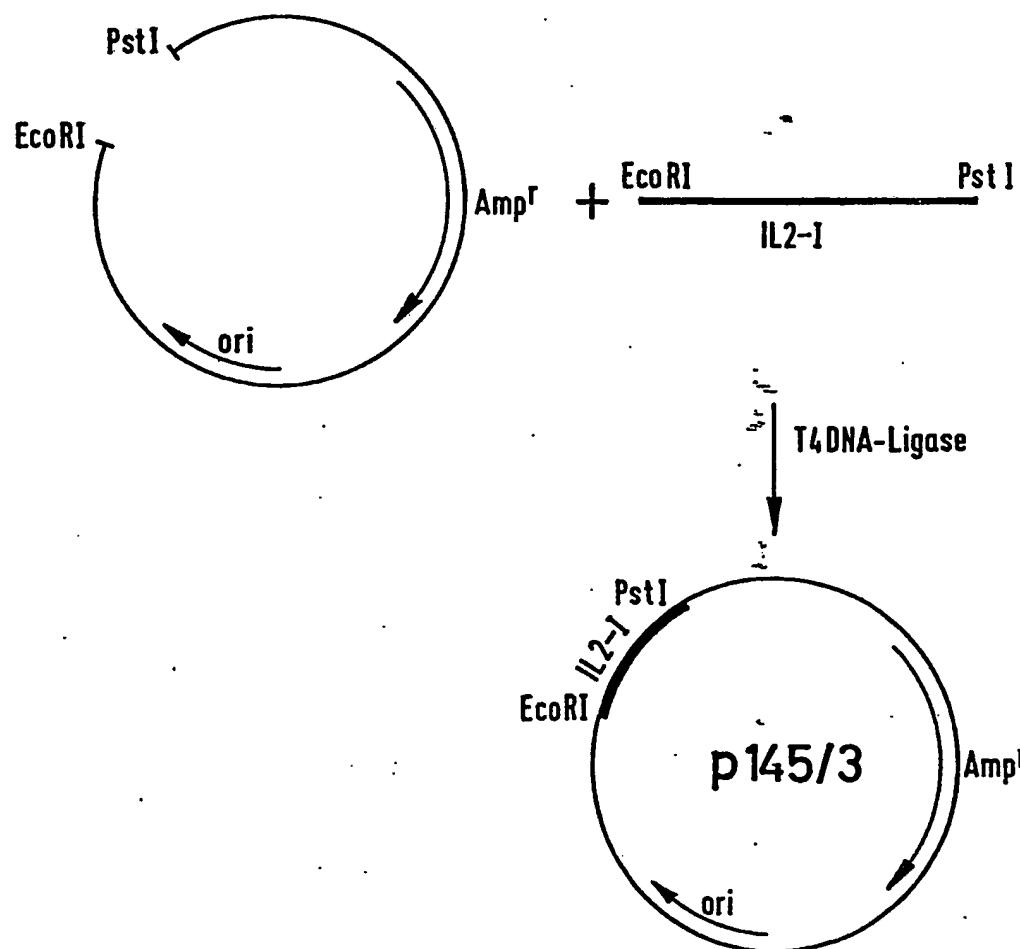


FIG. 1

Eco RI,  
Pst I



0163249

2/3

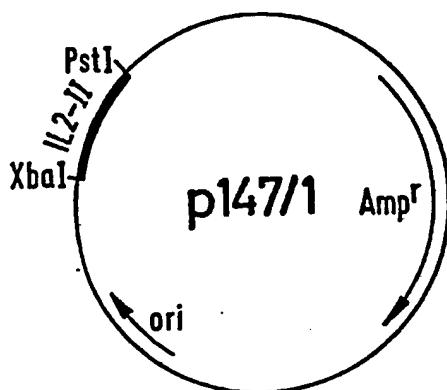


FIG.2

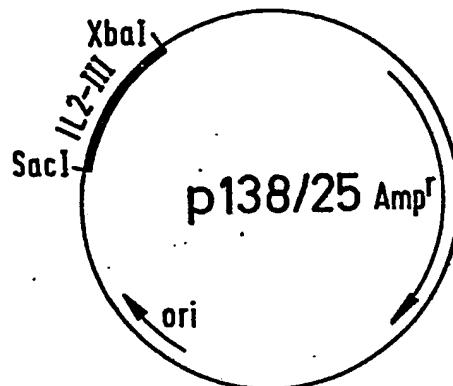


FIG.3

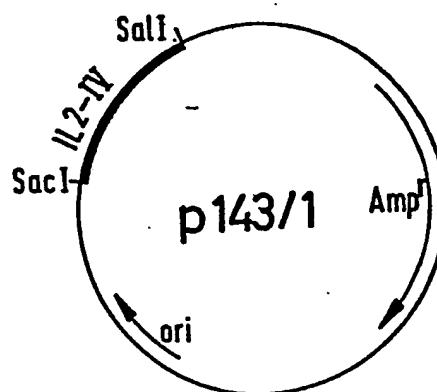


FIG.4

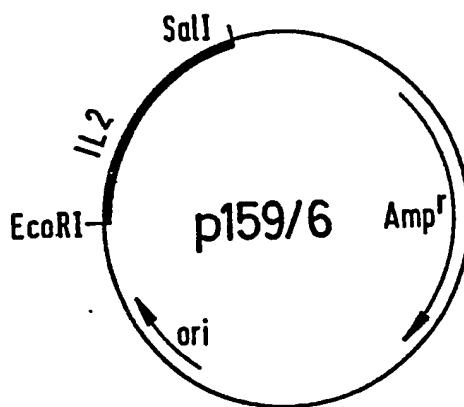


FIG.5

0163249

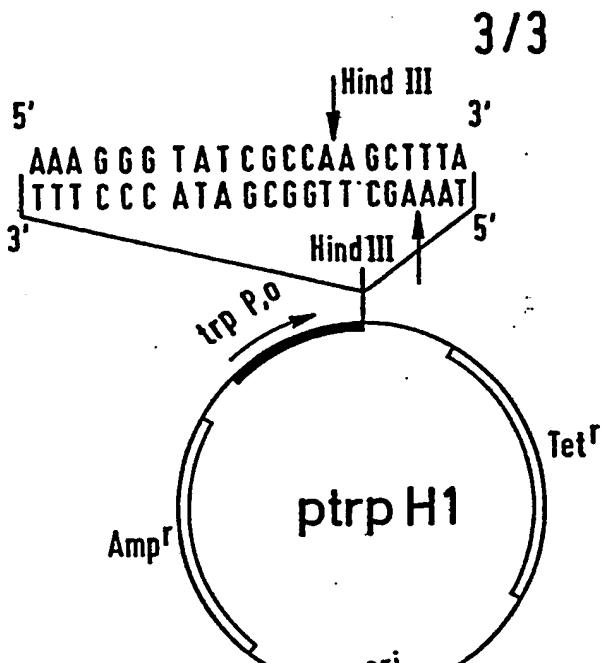


FIG. 6

